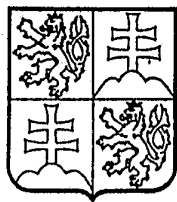


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

273 141

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 12 N 1/14

(21) PV 9588-87.K

(22) Přihlášeno 22 12 87

(40) Zveřejněno 12 07 90

(45) Vydáno 30 12 91

(75) Autor vynálezu

VALTR ZDENĚK ing.,
PAŠEK JAROSLAV,
ČERNÝ VÁCLAV ing.,
REJTMajerová ALŽBĚTA ing., KAZNĚJOV

(54)

Produkční kmen mikroorganismu *Aspergillus niger* pro povrchovou výrobu kyseliny citronové

(57) Předmětem řešení je produkční kmen *Aspergillus niger*, mutant CA-179 (CCM 8037) pro povrchovou výrobu kyseliny citronové, který dosahuje zvýšených výtěžností než dosud známé kmene. Kyselina citronová vyrobená z nového kmene je využitelná v potravinářském, farmaceutickém průmyslu a ve spotřební chemii.

Vynález se týká nového průmyslového kmene (mutanta) houby *Aspergillus niger*, vhodného pro průmyslovou aplikaci při povrchovém způsobu výroby kyseliny citronové.

Podstatou vynálezu je to, že kmen označený CS-179 (CCM 8037) dosahuje zvýšených výtěžností, tj. efektivnějšího využití cukrů při zkvašování melasových zápar povrchovým způsobem na normálních a zvýšených výškách zápary v kvasné misce, než především dosud ve výrobě užívaný kmen U-47 (CCM F-749), chráněný autorským osvědčením č. 245 107.

Průmyslové kmeny *Aspergillus niger* pro výrobu kyseliny citronové jsou posuzovány v první řadě z hlediska produkčního efektu, vyjádřeného výtěžností (přeměny v % nasazeného cukru na kyselinu citronovou) nebo produkcí vyjádřenou údajem g/m²/den. Dalším ukazatelem vhodnosti kmene je dostatečná sporulace houby kultivované na vhodné sporulační půdě (používá se pro tento kmen podle autorského osvědčení č. 196 162), což je podmínkou pro získání kvalitního očkovacího materiálu. Vhodnost kmene je posuzována i podle intenzity probíhajícího kvasného procesu, rychlosti klíčení a tvorby mladého mycelia, kvality vytvářené myceliální deky, její hmotnosti, soudržnosti a odolnosti proti působení infekčních mikroorganismů, viz autorské osvědčení č. 221 482.

Typ provozního kmene je charakterizován i současnou tvorbou vedlejších kyselin, především kyseliny oxalové, jejíž tvorba je ovlivňována kvalitou zpracovávané melasy a postupem při přípravě kvasného média.

Významným faktorem ovlivňujícím výtěžnost kvasného procesu je složení kvasného média, závislého na kvalitě zpracovávané základní suroviny, melasy a na vlastním technologickém postupu přípravy, tj. způsobu dávkování přísad a přísad při jeho přípravě, jejich množství, teplotním režimu, časovém sledu a způsobu sterilizace (čs. patent č. 121 832, čs. patent č. 130 243, autorské osvědčení č. 180 276, 245 107 a 233 664).

Nový provozní kmen CS-179 byl postupně ověřen v laboratoři i v provozu s přihlédnutím k výše uvedeným kritériím a porovnáván s dosud ve výrobě užívaným kmenem U-47 na různých typech melas. Plně se osvědčil a prokázal zvýšení produkční aktivity za stejnou dobu kvasného cyklu. Produkce kyseliny oxalové je zhruba o 1 až 2 % vyšší než u kmene U-47.

Předmětem vynálezu je nový produkční kmen mikroorganismu *Aspergillus niger* (mutant) CS-179, uložený v Čs. sbírce mikroorganismů Univerzity J. E. Purkyně v Brně, tř. Obránců míru č. 10 pod označením CCM 8037.

Morfologická a fyziologická charakteristika

Mutant *Aspergillus niger* CS-179 pěstován na glycerinové sporulační půdě (autorské osvědčení č. 196 162) o složení: 125 g glycerinu, 45 g sladového extraktu, 15 g NaCl, 0,5 g NH₄NO₃, 0,08 g MgSO₄aq, 0,0015 g CuSO₄aq a 30 g agaru na 1 litr půdy, při teplotě 32 °C tvoří během 36 až 40 hodin kulaté kolonie o průměru 0,5 až 0,7 cm, které ve středu kolonie vytváří sporulující konidiofory. Od 4. dne kultivace je plocha sporulačního agaru v kultivační nádobě celá pokryta souvislým sporulujícím myceliem se spodní nažloutlou, plošně mírně vrásněnou stranou. Po 8 dnech kultivace kultura vytváří hustý koberec mycelia s bohatou tvorbou konidií, které lze snadno oddělit mechanicky či odsátím a konzervovat.

Růst kmene na sladinném agaru a na Czapekově agaru jeví obdobnou charakteristiku s 12 až 20 hodinovým zpožděním se řidší sporulací.

Mikroskopický vzhled: konidie jsou hnědočerné až černé barvy, hladké, kulovitěho tvaru o průměru 3 až 4 μm, konidiofory vysoké 2 až 3 mm, konidiální hlavice o ø 0,1 mm, kulovité tmavě zabarvené s primárními a sekundárními sterigmaty s bohatou tvorbou konidií po 60 až 70ti hodinové kultivaci při 32 °C.

Mutanta CS-179 kultivovaná na produkčním melasovém médiu s 15 % cukru a optimální přísadou hexakyanatanu draselného, kyseliny fosforečné a přísadku ZnSO₄aq během 24 hodin vytváří souvislé tenké mycelium, které postupně sílí, bělá a zůstává po celou dobu povrchové fermentace hladkého bohatě vrásněného vzhledu s minimální sporulací.

Mutant CS-179 na rozdíl od současného provozního kmene U-47 po 9ti denním kvasném cyklu povrchového kvašení s výškou 9 až 12 cm melasového substrátu dosahuje za normálních podmínek těchto výsledků:

% výtěžnosti	U-47	75 až 80 %
	CS-179	82 až 85 %
tvorba kys. oxalové (% hmotnostní na vytvořenou kys. citronovou)	U-47	3 až 11 %
	CS-179	4 až 13 %

Prokazované rozdíly ve fyziologických vlastnostech kmenů U-47 a CS-179 jsou natolik významné, že provozní využití nového kmene zvýšenou výtěžností z hlediska výrobní produkce znamená výrazný přínos.

Nový produkční kmen CS-179 byl získán mutagenním působením UV světla na parentální kmen AS-68, uložený ve sbírce kmenů Lachema Kaznějov.

K mutaci použita germicidní lampa 30 W firmy Philips, vyzařující monochromatické světlo o vlnové délce 253,7 nm. Suspenze konidií parentálního kmene byla získána spláchnutím sporulující kultury sterilním 0,5 % roztoku tritonu a filtrací přes řídkou fritu k odstranění shluků spor a zbytků hyf. Suspenze naředěna na koncentraci cca 10^6 konidií/ml. 5 ml této suspenze bylo rozlito na plochu Petriho misky ($\varnothing$ 10 cm) a ozařováno UV lampou ze vzdálenosti 25 cm po dobu 5 až 25 minut při normální teplotě a intenzitě záření cca 4,5 J/m²/sec. Z přežitých kolonií byly získány monosporické kultury vypěstované na sporulační agarové půdě, které byly hodnoceny na produkci kyseliny citronové kvasnými testy s melasovou půdou. Z nich pak vybrán nejlepší a nejaktivnější mutant označený CS-179.

Příklad

Substrát pro provozní vaření v kvasných komorách byl připraven v provozním vařáku tak, že k podkladu vody bylo doměřeno množství melasy, aby roztok obsahoval 35 % hmot. cukru. Směs byla ohřáta na 85 °C, přidala se kyselina sírová na úpravu pH v rozmezí 6 až 6,6, hexakynoželeznatán draselný v množství 4 až 6% hmot. na nasazený cukr, kyselina fosforečná 0,2 až 0,6 % hmot. a roztok se ohřál k varu, který trval 60 minut. Po skončení varu se roztok doplnil a biologicky nezávadnou studenou vodou na konečných 14 % hmot. cukru. Po přidavku předepsaného množství kyseliny mravenčí a síranu zinečnatého se kvasný roztok naplnil do misek kvasné komory. Výška substrátu byla 9 cm, doba kvašení 9 dnů, teplota zkvašovaného roztoku 30 až 35 °C. Kvasné komory byly zaočkovány střídavě kmeny U-47 a CS-179.

Dále uvedené výsledky jsou průměrem skupin 10 až 20 provozních komor s oběma kmeny, zkvašujícími 3 druhy melas.

Melasa	Kmen	Výtěžnost %	% OX/KC
A	U-47	77,2	5,9
	CS-179	82,3	7,5
B	U-47	77,6	8,9
	CS-179	83,2	9,2
C	U-47	80,8	7,9
	CS-179	82,0	8,8

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Produkční kmen *Aspergillus niger*, mutant CS-179 (CCM 8037) pro povrchovou výrobu kyseliny citronové.